

Применение иммуногистохимического метода оценки цитопротективного действия антидиабетических препаратов

Иванов С.В.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Алкогольная кардиомиопатия (АКМП) – специфический вид дилатационной кардиомиопатии, возникающей при чрезмерном и длительном потреблении алкоголя. До настоящего времени не разработаны эффективные схемы её терапии, что связано, прежде всего, с отсутствием знаний о тонких механизмах её патогенеза. Индукция окислительного стресса, ведущего к повреждению ДНК и активации внутриклеточных сигнальных каскадов клеточной гибели, рассматривается как основной механизм этиопатогенеза алкогольной кардиомиопатии. Цель настоящего исследования – на разработанной ранее трансляционной модели АКМП у крыс оценить повреждённость ДНК и апоптоз клеток миокарда и влияние на эти показатели кардиопротективных средств. **Методы.** АКМП у крыс моделировали путём 24-недельной алкоголизации (10 % этанол как единственный источник воды; ежедневная доза этанола 5,0–6,5 г/кг). Триметазидин (20 или 30 мг/кг), фабомотизол (15 мг/кг) или их комбинацию (20+15 мг/кг) вводили внутривентрикулярно в течение последующих 4 недель абстиненции. Оценка повреждённости ДНК клеток миокарда проводили методом ДНК-комет в щелочной и нейтральной версиях. Уровень апоптоза на парафиновых срезах определяли методом TUNEL. **Результаты.** Установлено, что сформировавшаяся АКМП в период абстиненции не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК и апоптозом клеток миокарда. Выявлено снижение уровня кардиомиоцитов с высокой степенью фрагментации ДНК, детектируемых в виде атипичных ДНК-комет и являющихся, предположительно, клетками на стадии аутофагической фрагментации хроматина. Введение животным на фоне алкогольной абстиненции кардиопротекторов фабомотизола и триметазидина или их комбинации приводит к восстановлению уровней клеток с фрагментированной ДНК до значений контроля. **Заключение.** Полученные данные позволяют рассматривать появление кардиомиоцитов с фрагментированной ДНК как важный механизм регуляции и поддержания гомеостаза миокарда при АКМП.

Ключевые слова: диабет 2 типа; стрептозотозин; лития хлорид; лития карбонат; β -клетки; цитопroteкция

Для цитирования:

Иванов С.В. Применение иммуногистохимического метода оценки цитопротективного действия антидиабетических препаратов // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – № 4. – С.56–60. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10031.

The applying of immunohistochemical method for evaluating the cytoprotective effect of antidiabetic drugs

Ivanov S.V.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The article describes the experience of using the immunohistochemical method of analysis with anti-insulin monoclonal antibodies to assess the cytoprotective effect of lithium salts (carbonate and chloride) on pancreatic β -cells. The main advantage of this method over the classical staining methods, which reveal all types of Langerhans' cells, is selective insulin-producing β -cells identification. On the model of streptozotocin-induced type 2 diabetes in Wistar rats, a significant reduction in the β -cells number and a violation of their morphological structure was shown. Both lithium salts are known to be the GSK-3 β inhibitors. Our experiments revealed the pronounced cytoprotective activity, consisting in restoring of the insulinocytes' morphological characteristics, increasing the β -cells absolute and relative quantity and the percentage of small and medium-sized islets. A satisfactory correlation between the degree of the lithium salts cytoprotective effect and their hypoglycemic activity has been revealed.

Keywords: diabetes 2 type; streptozotocin; GSK-3 β ; lithium salts; β -cells; cytoprotection; immunohistochemistry

For citations:

Ivanov S.V. The applying of immunohistochemical method for evaluating the cytoprotective effect of antidiabetic drugs. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;4: 56–60. DOI: 10.24411 / 2587-7836-2018-10031.

Введение

Рост заболеваемости сахарным диабетом (СД) продолжает оставаться одной из основных проблем систем здравоохранения большинства стран мира, включая Российскую Федерацию. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в терапии заболевания, число больных, неудовлетворённых её качеством, остаётся по-прежнему высоким [1]. В этой связи разработка и создание оригинальных подходов к лечению СД является актуальной задачей медицинского сообщества.

Учитывая преобладающее значение СД второго типа (СД2) в структуре заболеваемости диабетом (более

80 % случаев), следует отметить, что инсулинорезистентность, характеризующаяся недостаточностью биологического ответа организма на инсулин при его нормальной концентрации в крови, приводит к компенсаторному усилению секреции гормона. Однако в условиях нарастающего энергодифицита возможность нормального функционирования β -клеток ограничена. Их истощение ведёт к неизбежной гибели и развитию абсолютной инсулиновой недостаточности. Перечисленные факты обуславливают перспективность применения цитопротекторных препаратов, способных предотвращать некроз β -клеток и декомпенсацию СД2 [2]. Это, в свою очередь, диктует необходимость

разработки информативной методики качественного и количественного анализа числа β -клеток.

Иммуногистохимический анализ (ИГА), основанный на обработке микропрепаратов изучаемых органов меченными антителами к выявляемому веществу (антигену), успешно применяется в лабораторной диагностике последние десятилетия. По сравнению с классическими гистологическими методами, он имеет неоспоримые преимущества, наиболее важными из которых являются высокая специфичность в отношении детектируемого объекта, чувствительность, позволяющая открывать вещество (антиген) при его низкой концентрации в ткани, а также интенсивность полученного сигнала. В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» нами начато внедрение методики ИГА панкреатических β -клеток, позволяющей оценивать влияние потенциальных антидиабетических препаратов на морфологические характеристики островков Лангерганса с использованием высокоспецифичных моноклональных антител к инсулину.

В данной статье будет приведено подробное описание этого метода, направленного на качественный и количественный анализ β -клеток поджелудочной железы и дифференциальную оценку их выживаемости на модели стрептозотоцин-индуцированного (СТЗ) СД2. В наших предыдущих исследованиях было выявлено наличие цитопротективного действия в отношении β -клеток у ряда нейропротективных веществ [4, 5]. В данной работе для верификации метода ИГА были изучены соли лития, выбор которых обусловлен наличием данных об их нейропротективном эффекте, связанным с ингибированием GSK-3 [3].

Материалы и методы

Дизайн эксперимента. Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Wistar с исходной массой тела 300–320 г. СД2 моделировали путём однократного внутрибрюшинного введения свежеприготовленного раствора СТЗ в дозе 40 мг/кг, растворённого в холодном цитратном буфере (pH = 4,5). В эксперимент включали только животных, у которых через 72 ч после введения СТЗ уровень глюкозы в крови составлял не менее 12–15 ммоль/л ($n = 40$). Крыс делили на 4 группы по 10 крыс в каждой. Группе пассивного контроля в первый день эксперимента вводился цитратный буфер, в последующие 28 дней — физиологический раствор. Группе активного контроля вводился СТЗ, в последующие 28 дней — физиологический раствор. Экспериментальным группам с третьего дня после инъекции СТЗ вводился лития хлорид в дозе 10 мг/кг либо лития карбонат в дозе 8,9 мг/кг (эквивалентно 10 мг/кг лития хлорида) в течение 28 дней. По окончании эксперимента животных умерщвляли декапитацией.

Подготовка препаратов. Для иммуногистохимического исследования островкового аппарата поджелудочные железы крыс экспериментальных групп

фиксируют в 10 % нейтральном формалине (pH = 7,4) (Sigma, США). Обезжизнение образцов проводили в восходящем ряду спиртов (дважды в 70 %, 95 % и дважды в 100 %) и ксилоле (в течение 1 ч в каждом растворителе), после чего заливали в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм выполняли на микротоме (Micritome Jung RM2035, Германия). Из каждого блока получали по 15–20 поперечных срезов из различных отделов поджелудочной железы и помещали их на стёкла, обработанные поли-L-лизин (Menzel-Glaser, 76 26 мм). Подготовленные микропрепараты (по 4–5 срезов на стекло) сушили на сухой бане при температуре 40° в течение 60 мин, после чего использовали для исследования.

Перед нанесением антител микропрепараты депарафинировали в двух сменах ксилола и гидратировали в нисходящем ряду спиртов (дважды в 95 % и дважды в 70 %) по 10 мин, после чего промывали в фосфатном буфере PBS (Sigma, США) (10 мин). С целью блокады эндогенных пероксидаз, способствующих неспецифическому окрашиванию ввиду высокой реакционной способности с детектирующим агентом, микропрепараты в течение 10 мин обрабатывали 3 % раствором пероксида водорода.

Иммуногистохимическая реакция. Для предотвращения неспецифического фонового окрашивания за счёт связывания первичных антител с компонентами ткани микропрепараты инкубировали с 10 % раствором нормальной козьей сыворотки (Normal Goat Serum, Abscam, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее срезы обрабатывали первичными моноклональными антителами к инсулину, полученными от морских свинок (anti-insulin GP 1:500, Abscam, Великобритания). В качестве среды для разведения антител использовали фосфатный буфер. Обработанные микропрепараты оставляли на 24 ч во влажной камере при температуре 2–4 °C.

Визуализация результатов иммуногистохимической реакции заключалась в инкубации микропрепаратов со вторичными моноклональными антителами, меченными пероксидазой (anti-insulin GP 1:500, Abscam, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим использованием набора реагентов (DAB Vector Peroxidase, США). Готовые микропрепараты вновь обезжизняли в восходящем ряду спиртов и ксилола и заключали в среду Eukitt (Panreac, Испания). Достоверность результатов исследования достигалась использованием негативных контролей антигенов и антител [6].

Микроскопический анализ. Морфометрическое исследование проводили с использованием микроскопа Aristoplan (Leitz, Германия) с цифровой камерой DCM-800 (Микромед, Россия), персонального компьютера и программного обеспечения ScopePhoto при увеличении 400, дающего информацию о площади β -клеток и микропрепарата в абсолютных единицах. Рассчитывали долю β -клеток в общей площади среза и количество

панкреатических островков. В каждом препарате анализировали все имеющиеся островки Лангерганса.

Исходя из данных литературы о неоднородности реакции β -клеток на повреждающее воздействие СТЗ [7], нами было предложено дифференцировать инсулиноты по площади, определяя процентное содержание их групп соответствующих размеров (менее 500 мкм², 501–2500 мкм², 2501–10000 мкм², более 10001 мкм²) в общем ряду.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Biostat. Проводился расчёт среднего арифметического значения M и стандартной ошибки среднего арифметического SEM. Характер распределения полученных данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Ввиду наличия нормального распределения данных, статистическую значимость различий между группами оценивали тестом ANOVA. Различие средних показателей считалось достоверным при $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи непараметрических количественных признаков использовался метод ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

В условиях СТЗ модели СД2 у животных группы активного контроля отмечалось повышение уровня гликемии до 24,1 ммоль/л (при уровне гликемии в группе пассивного контроля 6,1 ммоль/л). Соли лития показали гипогликемическую активность: введение лития хлорида способствовало снижению уровня сахара до

12,4 ммоль/л, лития карбоната до 12,9 ммоль/л. Кроме того, оба соединения восстанавливали положительную динамику массы тела, устраняли симптомы полифагии и полидипсии.

С целью оценки эффекта солей лития на морфологическом уровне через 24 ч после окончания терапии животные забивались декапитацией. Результаты морфометрического анализа поджелудочной железы приведены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют об уменьшении числа островков, а также абсолютного и относительного количества β -клеток в группе нелеченных диабетических животных по сравнению со здоровыми (рис. 1А, 1В). Островки у диабетических крыс характеризуются снижением количества инсулинотов, наличием вакуолизации, склерозирования и дистрофических изменений в структуре ткани. В некоторых островках сохранялись единичные разрозненные инсулин-позитивные клетки. Средняя площадь панкреатических островков у таких животных была почти в 8 раз меньше площади островков здоровых животных. Островки характеризовались неправильной формой. Процентное отношение суммарной площади β -клеток в поперечном срезе железы нелеченных диабетических крыс составляет около 9,5 %, в то время как у здоровых этот показатель достигал 28,1 %. Снижение доли β -клеток у животных активного контроля на 68 % по сравнению с пассивным контролем свидетельствует о наличии развитого СД2 и находится в полном соответствии с полученными ранее данными [8].

Таблица 1

Морфометрические показатели островков поджелудочной самцов крыс Wistar

№	Группа	Площадь β -клеток		Число островков
		абсолютная, мкм ²	в % от среза	
1	Пассивный контроль	239754,5 \pm 21500,7	28,08 \pm 2,29	17,8 \pm 1,89
2	Активный контроль	30538,4 \pm 4610,7#	9,50 \pm 1,31#	7,19 \pm 0,77
3	Лития карбонат	68672,7 \pm 13712,9*	14,00 \pm 1,79*	9,66 \pm 0,98*
5	Лития хлорид	76828,5 \pm 10584,9*	15,29 \pm 2,57*	10,52 \pm 0,91*

Примечание: * — достоверность различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0,05$.
— достоверность различий между активным контролем и пассивным контролем, $p < 0,05$.

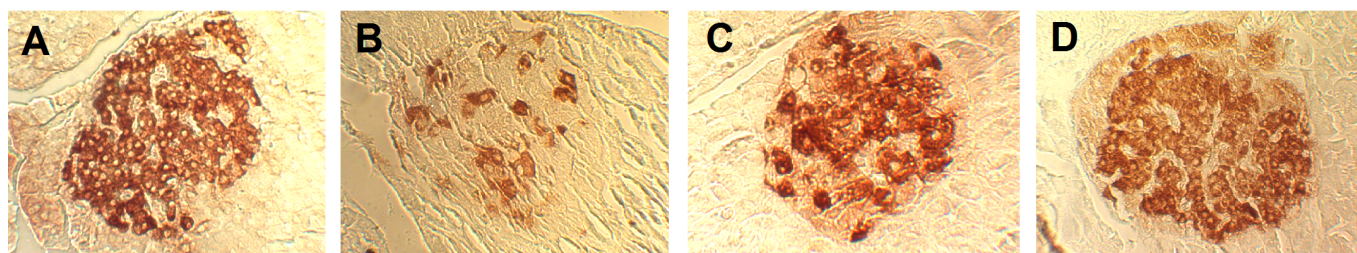


Рис. 1. Панкреатические островки животных разных групп. Ув. $\times 400$:

А — пассивный контроль; В — нелеченные диабетические крысы; С — диабетические крысы, леченные литием карбонатом; D — диабетические крысы, леченные литием хлоридом

Введение диабетическим крысам препаратов лития приводит к заметному восстановлению количества островков и морфологических характеристик β -клеток (рис. 1С, 1D). Отмечено преобладание островков округлой формы. Среднее количество островков в группе лития карбоната составляло 9,66, лития хлорида — 10,52, что в среднем в 1,5 раза превышает данный показатель у нелеченых диабетических животных. Суммарная площадь β -клеток у животных выше таковой у группы активного контроля в 1,5 раза в случае терапии карбонатом лития и в 2 раза — хлоридом лития. Вы-

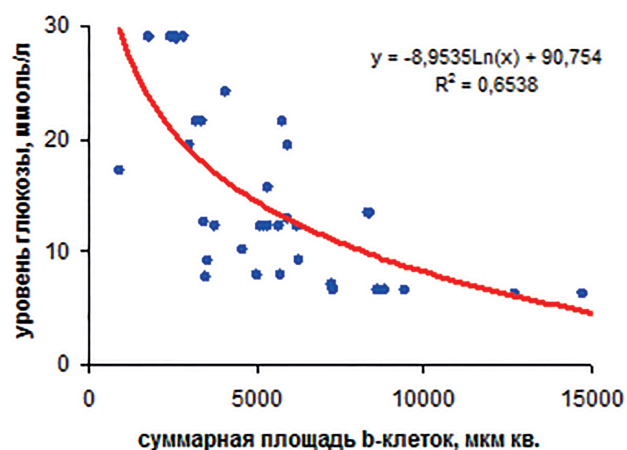


Рис. 2. Корреляционная связь площади панкреатических β -клеток в срезах с уровнем глюкозы самцов крыс Wistar

раженность показателей морфометрии коррелирует с показателями уровня глюкозы в крови: коэффициент корреляции уровня глюкозы с суммарной площадью панкреатических β -клеток составляет 0,653 (рис. 2).

Нами выполнен анализ распределения островков β -клеток по показателю суммарной площади у

животных различных групп (рис. 3). Если у здоровых животных преобладают крупные островки, площадью более 10000 мкм² и практически отсутствуют мелкие, площадью до 500 мкм², то у крыс группы активного контроля доминируют островки малых размеров. Эти данные полностью соответствуют результатам, ранее полученным в экспериментах на мышах, у которых СД моделировался гиперактивацией GSK-3 β [6]. Нами показано, что применение препаратов лития позволяет сохранить выживаемость β -клеток. Это отражает показатель количества крупных островков: у животных пассивного контроля их содержание составляло 38 %, у нелеченных диабетических крыс оно снижалось до 10 %, в то время как терапия солями лития способствовала увеличению их числа до 17–18 %.

Основное преимущество ИГА состоит в том, что он селективно выявляет инсулинопродуцирующие β -клетки, тогда как при использовании других методов, например окраски гематоксилин-эозином, имеет место неспецифическое окрашивание всех типов клеток островков Лангерганса. Если при окраске гематоксилин-эозином по Гомори нами было выявлено 23,0 % выживших клеток, то в случае применения ИГА отмечено снижение доли выживших β -клеток до 9,5 % [4]. Это сопоставление свидетельствует о более точной идентификации и дифференциации панкреатических β -клеток методом ИГА.

Таким образом, значимость метода ИГА для оценки цитопротективного действия антидиабетических препаратов подтверждена данными изучения солей лития, выбор которых обусловлен представлениями о роли гиперактивности GSK-3 в развитии СД и их способности ингибировать этот фермент [3]. Активность солей лития проявлялась в восстановлении абсолютного и относительного количества инсулинопродуцирующих клеток, увеличении доли островков средних и крупных размеров и нормализации морфологических характеристик инсулиноцитов.

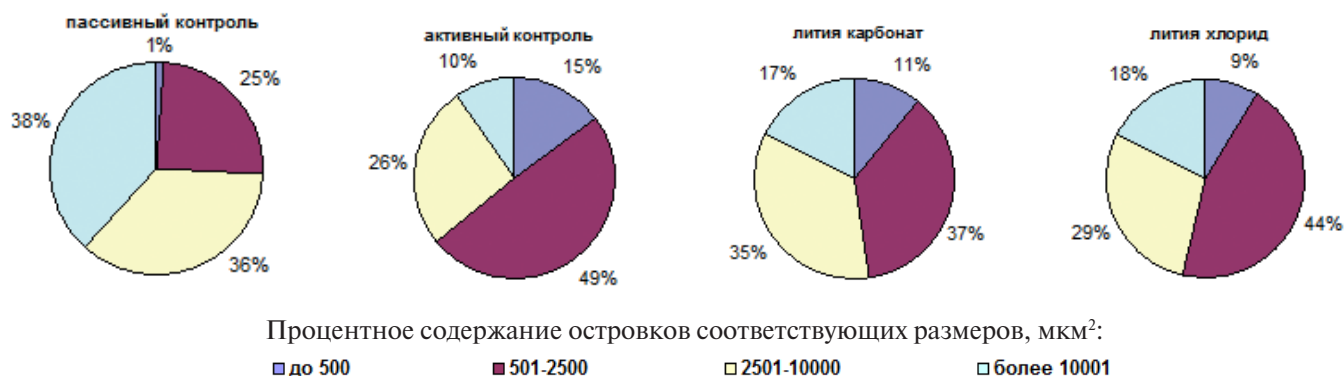


Рис. 3. Дифференциация островков β -клеток по площади у животных различных экспериментальных групп

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванов Сергей Витальевич
Автор, ответственный за переписку
 e-mail: ivanov-sv-tver@mail.ru
 ORCID: 0000-0003-0438-9108
 SPIN-код: 6222-8337
 м. н. с. лаборатории психофармакологии
 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
 фармакологии имени В.В. Закусова»

Ivanov Sergey
Corresponding author
 e-mail: ivanov-sv-tver@mail.ru
 ORCID: 0000-0003-0438-9108
 SPIN-code: 6222-8337
 Research Assistant at the laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Дедов И.И., Шестакова М.В. Клинические рекомендации. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом // *Сахарный диабет*. — 2015. — №18(1S). — С.1–112. [Dedov II, Shestakova MV. Standards of specialized diabetes care. *Diabetes Mellitus*. 2015;18(1S):1–112. (In Russ).] DOI: 10.14341/DM20151S1-112
2. Петеркова В.А., Лаптев Д.Н. Перспективы терапии, направленной на восстановление пула β -клеток, при сахарном диабете // *Сахарный диабет*. — 2009. — №3 — С.6–9. [Peterkova VA, Laptev DN. Prospects for therapy aimed at restoring the beta-cells pool in patients with diabetes mellitus (review of literature). *Diabetes Mellitus*. 2009;3:6–9. (In Russ).]
3. Woodgett JR. Physiological roles of glycogen synthase kinase-3: potential as a therapeutic target for diabetes and other disorders. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003;3(4):281–290.
4. Ostrovskaya RU, Zolotov NN, Ozerova IV, et al. Noopept normalizes parameters of the incretin system in rats with experimental diabetes. *Bull Exp Biol Med*. 2014;157(3):344–349. DOI: 10.1007/s10517-014-2562-5
5. Ostrovskaya RU, Yagubova SS, Gudasheva TA, et al. Low-Molecular-Weight NGF Mimetic Corrects the Cognitive Deficit and Depression-like Behavior in Experimental Diabetes. *Acta Naturae*. 2017;9(2):94–102.
6. Снигур Г.Л., Смирнов А.В. К вопросу стандартизации патогистологической диагностики сахарного диабета // *Вестник ВолГМУ*. — 2010. — №3 (35) — С.112–118. [Snigur GL, Smirnov AV. To the question of standardization of pathohistological diagnostics of the diabetes mellitus. *Vestnik VolGМУ*. 2010;3(35):112–118. (In Russ).]
7. Feng ZC, Donnelly L, Li J, et al. Inhibition of Gsk3 β activity improves β -cell function in c-Kit^{Wv/+} male mice. *Lab. Invest*. 2012;92(4):543–555. DOI: 10.1038/labinvest.2011.200
8. Novelli M, Bonamassa B, Masini M, et al. Persistent correction of hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice by a non-conventional radical scavenger. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2010;382(2):127–137. DOI: 10.1007/s00210-010-0524-7